



(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-301873

(43)公開日 平成8年(1996)11月19日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 D 487/22		9271-4C	C 0 7 D 487/22	
// A 6 1 K 31/555	A B Z		A 6 1 K 31/555	A B Z
B 0 1 D 53/14			B 0 1 D 53/14	B

審査請求 未請求 請求項の数6 O L (全 9 頁)

(21)出願番号	特願平7-106314	(71)出願人	000218719 土田 英俊 東京都練馬区関町南2丁目10番10号
(22)出願日	平成7年(1995)4月28日	(72)発明者	土田 英俊 東京都練馬区関町南2-10-10
		(72)発明者	西出 宏之 東京都中野区若宮3-28-13
		(72)発明者	小松 晃之 東京都世田谷区下馬1-40-4
		(74)代理人	弁理士 鈴江 武彦

(54)【発明の名称】 ポルフィリン金属錯体-アルブミン包接化合物及び酸素運搬体

(57)【要約】

【目的】ポルフィリン金属錯体を酸素吸脱着部位として含有する酸素運搬体として生体適合性により優れ、工業的規模での製造も比較的容易な新規化合物および酸素運搬体を提供する。

【構成】周期律第4及び第5周期に属する遷移金属イオンを中心配位金属とする置換ポルフィリン金属錯体をアルブミンに包接させてなるポルフィリン金属錯体-アルブミン包接化合物、及びこの包接化合物を有効成分とする酸素運搬体。

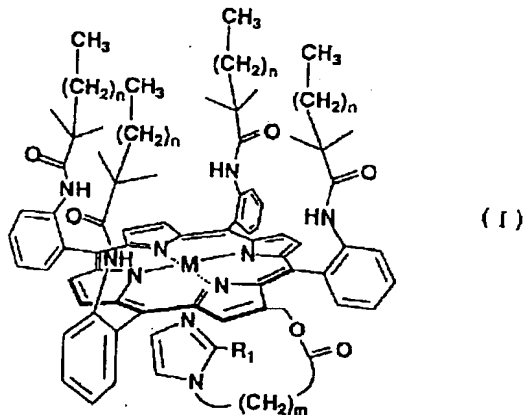
1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 周期律第4及び第5周期に属する遷移金属イオンを中心配位金属とする置換ポルフィリン金属錯体をアルブミンに包接させてなるポルフィリン金属錯体-アルブミン包接化合物。

【請求項2】 下記化1に示される一般式(I)

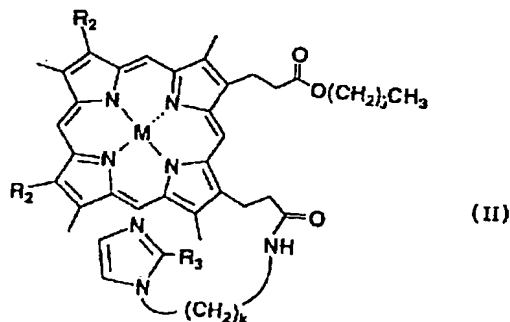
【化1】



(一般式(I))において、 $R_1$  は水素又はメチル基、 $M$  は鉄又はコバルトイオン、 $n$  は0ないし17の整数、及び $m$  は7ないし17の整数で表わされる5、10、15、20-テトラ[ $\alpha, \alpha, \alpha, \alpha$ -o-(置換アミド)フェニル]ポルフィリン金属錯体をアルブミンに包接させてなるポルフィリン金属錯体-アルブミン包接化合物。

【請求項3】 下記化2に示される一般式(II)

【化2】



(一般式(II))において、 $R_2$  はビニル基又は式-( $CH_2$ ) $h$ CHO( $CH_2$ ) $h$ 、 $CH_3$  (ここで、 $h$  は0ないし17の整数)で表わされる1-アルカンオキシエチル基、 $R_3$  は水素又はメチル基、 $M$  は鉄又はコバルトイオン、 $j$  は0ないし17の整数、及び $k$  は3ないし10の整数で表わされるポルフィリン金属錯体をアルブミンに包接させてなるポルフィリン金属錯体-アルブミン包接化合物。

【請求項4】 鉄又はコバルトが+2価の状態にある請求項2又は3記載の包接化合物。

2

【請求項5】 アルブミンがヒト血清アルブミン又は組換えヒト血清アルブミンである請求項1ないし4のいずれか1項記載の包接化合物。

【請求項6】 請求項1ないし5のいずれか1項記載のポルフィリン金属錯体-アルブミン包接化合物を有効成分として含む酸素運搬体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、酸素吸脱着部位としてポルフィリン金属錯体を包接した新規包接化合物、及びこの包接化合物を有効成分とする酸素運搬体に関する。

【0002】

【従来の技術】ヘモグロビンやミオグロビン中に存在するポルフィリン鉄(II)錯体は、酸素分子を可逆的に吸脱着する。このような天然のポルフィリン鉄(II)錯体に類似する酸素吸脱着機能を合成の錯体により達成させようとする研究は、従来から数多く報告されている(例えば、J. P. コールマン(Collman), Accounts of Chemical Research, 10, 265(1977); F.

バソロ(Basolo), B. M. ホフマン(Hoffman), J. A. アイバーズ(Ibers), 同, 8, 384(1975)等参照)。ところで、合成の化合物(特に合成のポルフィリン金属錯体等)を用いてその機能を生理条件下(生理塩水溶液(pH7.4)中室温ないし37℃)で再現させ、医療用途、例えば人工赤血球、臓器保存液、あるいは人工肺等のための酸素供給液に利用しようとする場合には、次の条件、すなわち、(i)酸素結合能を増大させるためには一般に軸塩基配位子の存在が必要であるが、そのような配位子として広く用いられているイミダゾール誘導体には薬理作用を有するものがあり、生体内毒性の高いものがあるので、その濃度を最小限に抑制すること、及び(ii)ポルフィリン金属錯体を水に可溶化するだけでなく、これを微視的疎水性環境内に包埋・固定することにより、中心金属のプロトンによる酸化、及び $\mu$ -オキソ二量体を經由する酸化を防止して酸素配位錯体を安定に保持することが必要である。

【0003】上記条件(i)については、本発明者等は、既に、イミダゾリル基を共有結合によりポルフィリン環に結合させたポルフィリン化合物、すなわち分子内に軸塩基を持つ置換ポルフィリン化合物(ポルフィリン/イミダゾールのモル比を1:1の最小必要量に抑制したこととなる)を合成し、これが安定な酸素配位錯体を形成することを明らかにしている(特開平6-271577号公報参照)。このポルフィリン錯体において、特にエステル結合により軸塩基を結合した場合には、生分解性も高く、生体内投与に際してきわめて有利なものとなる。すなわち、安全性の高い酸素結合部位(ポルフィリン金属錯体)の開発は、本発明者等により確立されているということが出来る。

【0004】他方、上記条件(ii)、すなわち水溶液中

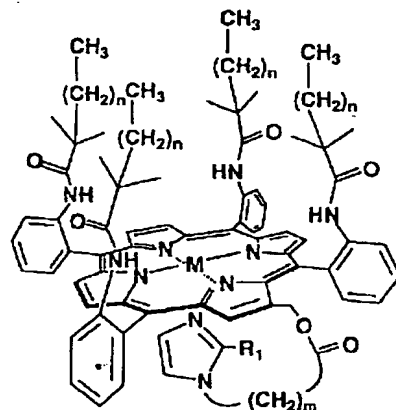
でポルフィリン金属錯体に対し微視的疎水環境を提供することについては、界面活性剤からなるミセル又はリン脂質からなる二分子膜小胞体を利用することが知られている。しかしながら、ミセルはその形態が動的であり、二分子膜小胞体に比べ安定性の点で劣るとともに、その形成する疎水環境の疎水性も低い。従って、形状が比較的安定で十分な疎水性領域を提供できる二分子膜小胞体が錯体に疎水環境を提供するためのキャリアーとして利用されることが多い。これに基づき、リン脂質小胞体の二分子膜間にポルフィリン金属錯体を高い配向性をもって分散させることにより生理条件下でも安定に酸素を輸送できる酸素運搬体の開発が継続して推進されてきた。

【0005】本発明者等も、ポルフィリン環上に末端親水性アルキル置換基を導入し、ポルフィリンに両親媒性構造を付与すれば、リン脂質二分子膜の疎水環境へ高い配向性をもって包埋できるものとの考えから、既に種々の両親媒性ポルフィリン鉄錯体を合成し、これらのポルフィリン錯体をリン脂質二分子膜中に包埋・配向させることにより、水相系において有効な一連の酸素運搬体を開発している（例えば、特開昭60-101490号公報、特開昭58-213777号公報参照）。

【0006】しかし、これら酸素運搬体では、多量のリン脂質を使用するため、工業的規模での製造の点、また代謝を含む生体適合性の点でなお改善の余地がある。

【0007】

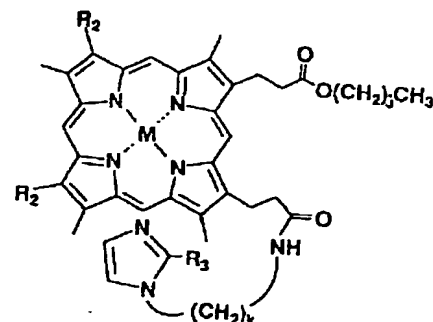
【発明が解決しようとする課題】そこで、本発明は、ボ\*



(I)

【0011】（一般式（I）において、 $R_1$  は水素又はメチル基、 $M$ は鉄又はコバルトイオン、 $n$ は0ないし17の整数、及び $m$ は7ないし17の整数）で表わされる5, 10, 15, 20-テトラ[ $\alpha, \alpha, \alpha, \alpha$ - $o$ -（置換アミド）フェニル]ポルフィリン金属錯体であるか、または下記4に示される一般式（II）

【化4】



(II)

【0012】(一般式(II))において、 $R_1$ はビニル基又は式 $-(CH_2)_hCHO(CH_2)_j$ 、 $CH_3$ （ここで、 $h$ は0ないし17の整数）で表わされる1-アルカンオキシエチル基、 $R_2$ は水素又はメチル基、 $M$ は鉄又はコバルトイオン、 $j$ は0ないし17の整数、及び $k$ は3ないし10の整数）で表わされるボルフィリン金属錯体である。

【0013】酸素運搬体としては、式(I)又は式(II)で表わされるボルフィリン金属錯体における中心金属 $M$ である鉄又はコバルトは+2価の状態にある。

【0014】アルブミンは、その由来を特に制限するものではないが、ヒト血清アルブミン又は組換えヒト血清アルブミンであることが好ましい。特に近年、遺伝子組換え技術の進展により、構造・組成及び物理化学的特徴がヒト血清アルブミンと全く同一である高純度の組換えヒト血清アルブミンが開発されてきており（横山、大村、臨床分子医学、1, 939 (1993) 参照）、この組換えヒト血清アルブミンに置換ボルフィリン金属錯体を包接させてなるボルフィリン金属錯体-組換えヒト血清アルブミン包接化合物は、全合成系として提供できるので、工業的規模での製造も比較的容易である。

【0015】また、本発明によれば、上記本発明のボルフィリン金属錯体-アルブミン包接化合物を有効成分として含む酸素運搬体が提供される。

【0016】以下、本発明をさらに詳しく説明する。本発明において、以後詳述するボルフィリン金属錯体を包接するアルブミンは、血液中ではコロイド浸透圧調整を主な役割とする単純タンパク質であるが、また栄養物質やその代謝産物あるいは薬物等の輸送タンパク質としても機能している。本発明は、このような、他のタンパク質には見られないアルブミンの非特異的結合能に着目して完成されたものである。

【0017】アルブミンは、血漿タンパク質であるから、生体への適用、特に赤血球代替物としての利用に関しては、リン脂質小胞体を用いる系に比べて格段に有利である。

【0018】本発明に用いるアルブミンは、ヒト血清アルブミン、組換えヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミン等その由来に制限はない。なお、ヒトへの適用を考えた場合、ヒト血清アルブミン又は組換えヒト血清アルブミンを用いることが好ましい。

【0019】本発明において、アルブミンにより包接される置換ボルフィリン金属錯体は、周期律第4及び第5周期に属する遷移金属（すなわち、クロム、マンガン、鉄、コバルト、ルテニウム等）イオンを中心配位金属とする置換ボルフィリン金属錯体であれば特に制限はない。中心配位金属としては、鉄及びコバルトが好ましく、鉄が特に好ましい。なお、置換ボルフィリン金属錯体は、イミダゾールを結合したものであることが特に有用である。

【0020】本発明の特に好ましい態様において、置換ボルフィリン金属錯体は、上記一般式(I)又は(II)で表わされるものである。

【0021】一般式(I)で表わされる5, 10, 15, 20-テトラ[ $\alpha, \alpha, \alpha, \alpha$ -o-（置換アミド）フェニル]ボルフィリン金属錯体は、そのアルキルイミダゾリル基がボルフィリン環の2-位に結合していることが重要である。本発明者らの研究によれば、分子内にそのようなイミダゾリル基を持たないボルフィリン錯体は、外部から小過剰のイミダゾール誘導体（例えば、1-メチルイミダゾール）を添加しても、水相系では安定な酸素錯体を生成することなく直ちに劣化した。

【0022】また、一般式(II)で示されるボルフィリンは、生体中のヘモグロビンと同様のプロトボルフィリンIX誘導体であり、生体適合性に優れることはいうまでもない。一般式(II)で表わされる化合物のうち、 $R_1$ がビニル基であるボルフィリン誘導体は、T. G. トレーラー (Traylor) ら、J. Am. Chem. Soc., 101, 6716 (1979) に記載の方法により合成できる。 $R_2$ が1-アルカンオキシエチル基であるボルフィリン誘導体は、例えば以下のプロセスにより合成できる。

【0023】土田ら、Chem. Lett., 1994, 1953に記載の方法により合成した8, 13-ビス(1'-アルカンオキシエチル)-3, 7, 12, 17-テトラメチル-2, 18-ビス(2'-アルカンオキシカルボニルエチル)-21, 23H-ボルフィリンを1~5規定の塩酸に溶解し、室温で1~24時間攪拌する。ボルフィリンが塩酸に不溶の場合は、テトラヒドロフラン、アセトン等の有機溶媒を適宜添加してボルフィリンを均一に溶解させることが必要である。反応終了後、溶媒を減圧留去し、残渣をクロロホルム、ジクロロメタン、ベンゼン等で抽出し、純水で洗浄する。その後、有機層を蒸発乾固し、これをシリカゲルカラムで分離精製して、エステル結合の1つを加水分解したモノエステル体を得る。このモノエステル体を窒素雰囲気下でトリエチルアミン、ビリジン、4-ジメチルアミノビリジン等の塩基を含む無水テトラヒドロフラン、ジメチルホルムアミド等に溶解し、-20~30℃、望ましくは-20~0℃でビバリン酸クロリドを加え、10~60分間攪拌した後、さらに1-(3-アミノアルキル)イミダゾールを滴下し、-20~30℃で1~24時間反応させる。反応溶媒を減圧除去後、残渣をクロロホルム、ジクロロメタン、ベンゼン等の有機溶媒で抽出し、純水で洗浄する。最後に、有機層を減圧乾固し、これをシリカゲルカラムで分離精製し、所望の8, 13-ビス(1'-アルカンオキシエチル)-2-(2'-アルカンオキシカルボニルエチル)-18-(2'-(3"-イミダゾリル)アルキル)アミノカルボニルエチル)-3, 7, 12, 17-テトラメチル-21, 23H-ボ

10

20

30

40

50

ルフィリンを得る。

【0024】さらに、中心金属の導入、すなわち、鉄錯体、コバルト錯体などへの誘導は、常法（例えば、D. ドルフィン編、ザ・ポルフィリン、1978年、アカデミック・プレス社等参照）に従って行うことができる。一般に、鉄錯体の場合には、ポルフィナト鉄（III）錯体が、コバルト錯体の場合には、ポルフィナトコバルト（II）錯体が得られる。

【0025】さて、本発明の置換ポルフィリン金属錯体-アルブミン包接化合物を調製するには、まず、ポルフィリン金属（例えば、2-（8'-（N-イミダゾリル））オクタノイルオキシメチル）-メソ-テトラ（ $\alpha, \alpha, \alpha, \alpha$ -o-ビバルアミドフェニル）ポルフィナト鉄（III）錯体を水溶性の溶媒（例えば、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、メタノール等）に溶解し、これにアルブミン（例えば、ヒト血清アルブミン）の水溶液（溶媒として、例えば水、リン酸緩衝液（pH5~9）、生理食塩水、クレープス-リンガー溶液等）を加えた後、軽く振盪する。得られた水分散液を限外ろ過（例えば、限外分子量20,000~40,000の限外ろ過膜を使用）により総量の10%程度まで濃縮した後、再び水等を加え、限外ろ過を行う操作を繰り返すと、ポルフィリン金属錯体-アルブミン包接化合物が得られる。この分散液は、4~35℃で数ヶ月間保存後でも沈殿、凝集等はまったく認められず安定である。

【0026】なお、ポルフィリン金属錯体の中心金属が鉄（III）である場合、還元剤（例えば、亜二チオン酸ナトリウム、アスコルビン酸等の水溶液）を窒素雰囲気下で添加する等の常法により中心鉄を3価から2価へ還元することにより、酸素結合活性を付与することができる。この還元は、還元剤の添加によるばかりでなく、パラジウムカーボン/水素ガスによっても行うことができる。例えば、ポルフィリン鉄（III）錯体を乾燥ジクロロメタン、ベンゼン、トルエン等に溶解し、少量のパラジウムカーボンを添加した後、水素ガスを室温で十分に吹き込むことにより中心鉄を還元することができる。還元後、パラジウムカーボンをろ別し、ろ液を真空乾燥した後用いることができる。以上の還元は、包接反応の前に行うことができる。

【0027】このようにして得られた本発明のポルフィリン金属錯体-アルブミン包接化合物は、アルブミンによって形成される内部疎水領域内にポルフィリン金属錯体が包埋・固定（包接）されたものである。なお、アルブミン1モルに包接・結合されたポルフィリン金属錯体の数は、例えば、スカチャード・プロット（Scatchard plot）（C. J. Halfman, T. Nishida, Biochemistry, 11, 3493（1972））等を作成することにより決定できる。アルブミン（例えば、ヒト血清アルブミン）に対する置換ポルフィリン金属錯体（例えば、2

-（8'-（2"-メチル-1-イミダゾリル））オクタノイルオキシメチル-メソ-テトラ（ $\alpha, \alpha, \alpha, \alpha$ -o-ビバルアミドフェニル）ポルフィナト鉄（II）錯体）の結合数は、1~3である。

【0028】上に述べたように、本発明のポルフィリン金属錯体-アルブミン包接化合物においては、酸素吸着席であるポルフィリン金属錯体がアルブミンの内部疎水環境内に固定されているため、中心金属のプロトンによる酸化、及び $\mu$ -オキシ二量化を経由する酸化劣化過程が完全に抑止される結果、本発明の包接化合物は水相系においても安定な酸素配位錯体が保持できる。

【0029】また、本発明のポルフィリン金属錯体-アルブミン包接化合物は、その酸素結合部位が合成の置換ポルフィリン金属錯体で構成されているため、その酸素親和力、毒性、生分解性等は、当該置換ポルフィリン金属錯体の化学構造を制御することにより任意に調整することができる。また、アルブミンへの包接に際しては、ポルフィリン金属錯体（被包接分子）の親疎水バランス（極性）や分子容がきわめて重要な因子となっている。が、テトラフェニルポルフィリン誘導体（一般式（I）など）のようなかさ高い分子（その分子容は、10~21nm<sup>3</sup>であり、一般式（II）等のプロトポルフィリンの分子容2~3.5nm<sup>3</sup>の約2~10倍に相当する）でも包接結合して十分に所期の機能を発揮することが本発明により明らかにされた。このことは、今後、アルブミン錯体の分子設計に新しい知見を与えるものと期待される。

【0030】上に述べた説明からも明らかなように、本発明のポルフィリン金属錯体-アルブミン包接化合物は、酸素と接触すると速やかに安定な酸素配位錯体を生成する。そして、この酸素配位錯体は、酸素分圧に応じて酸素を吸脱着できる。この酸素吸脱着は酸素分圧差により可逆的に繰り返し安定に行うことができる。また、酸素結合解離は、迅速であり、本発明の包接化合物は生体内血流中でも酸素を効率よく運搬できる半人工系酸素運搬体として、また組換えヒト血清アルブミンを用いた場合には、全合成系酸素運搬体として機能し得る。

【0031】本発明者らの実験によれば、ポルフィリン鉄（II）錯体-アルブミン包接化合物（例えば、2-（8'-（2"-メチル-1-イミダゾリル））オクタノイルオキシメチル-メソ-テトラ（ $\alpha, \alpha, \alpha, \alpha$ -o-ビバルアミドフェニル）ポルフィナト鉄（II）錯体-ヒト血清アルブミン包接化合物）の25℃における酸素配位錯体の半減期（ $\tau_{1/2}$ ）は16時間以上である。これに対し、同条件でリン脂質小胞体の二分子層間に包埋した同酸素配位錯体の半減期は4時間以上であり、また界面活性剤トリトンX-100（商品名）を用いて分散させたミセル溶液中では1分以下と短かった。このように、ポルフィリン金属錯体をアルブミンの内部疎水環境内に包接させることにより酸素配位錯体の寿命が大幅

に延長されることが明らかとなっている。

【0032】以上詳述した置換ポルフィリン金属錯体をアルブミンの内部疎水領域に包接した結果優れた酸素結合機能を有する本発明のポルフィリン金属錯体-アルブミン包接化合物は、上に述べたような酸素運搬体として機能するばかりでなく、例えば中心金属が周期律表第4～第5周期の遷移金属である場合、広く酸化還元反応、酸素酸化反応、活性酸素分解反応、光酸素活性化反応、さらには酸素添加反応の触媒として作用し得るものである。従って、本発明の包接化合物は、前述のようにそれ自体人工酸素運搬体として、またガス吸着剤、酸素吸脱着剤、酸素酸化・還元触媒、酸素添加反応触媒、光酸素活性化触媒などとして有用である。また、本発明の包接化合物は、その製造が簡単であり、特に組換えヒト血清アルブミンを用いた場合などは工業的規模での生産に適している。

#### 【0033】

【実施例】以下本発明を実施例により説明するが、本発明はそれらに限定されるものではない。

#### 実施例1

特開平6-271577号公報記載の手法に従い、2-(8'-(2"-メチル-1"-イミダゾリル))オクタノイルオキシメチル)-5, 10, 15, 20-テトラキス( $\alpha$ ,  $\alpha$ ,  $\alpha$ ,  $\alpha$ -o-ビバルアミドフェニル)ポルフィナト鉄(III)錯体を得た。この錯体(0.14ミリモル)のジメチルスルホキシド溶液(12ml)にヒト血清アルブミン(0.1ミリモル)のリン酸緩衝水溶液(pH7.4, 1/30mM)100mlを加え、振盪した。その混合液を限外ろ過装置(アドバンテック製ウルトラフィルター:限外分子量20,000)で20mlまで濃縮した。この濃縮物に92mlのリン酸緩衝水溶液(pH7.4, 1/30mM)を加え、振盪した後、再度限外ろ過による濃縮及びリン酸緩衝水溶液による希釈を行った。こうして、所望のポルフィリン鉄(III)錯体-アルブミン包接化合物の分散液を得た。この分散液は、室温又は4℃で数ヶ月間保存しても沈殿・凝集等が認められず、きわめて安定であった。

【0034】この分散液に少量の亜二チオン酸水溶液を窒素雰囲気下で添加し、ポルフィリン錯体の中心鉄を+2価に還元した。こうして、目的とする2-(8'-(2"-メチル-1"-イミダゾリル))オクタノイルオキシメチル)-5, 10, 15, 20-テトラキス( $\alpha$ ,  $\alpha$ ,  $\alpha$ ,  $\alpha$ -o-ビバルアミドフェニル)ポルフィナト鉄(II)錯体-アルブミン包接化合物の分散液を得た。

【0035】この分散液に一酸化炭素ガスを通気した後、窒素換気しながら、氷浴中で光照射(500W)すると、デオキシ体が得られる。この分散液を1/50に希釈し、石英製分光測定用セルに移し、窒素下で密封した。その可視吸収スペクトルは $\lambda_{max}$ が563nm、5

42nm、439nmであり、分子内塩基が1つ配位した5配位デオキシ型に相当する。

【0036】この分散液に酸素ガスを通気すると、直ちにスペクトルが変化し、 $\lambda_{max}$ 548nm、424nmのスペクトルが得られた。これは、アルブミンに包接されたポルフィリン鉄(II)錯体が酸素化錯体となっていることを明らかに示すものである。この酸素化錯体の分散液に窒素を通気すると、可視吸収スペクトルは酸素化型スペクトルから再びデオキシ型スペクトルへ変化し、これにより酸素の吸脱着が可逆的に生じることが確認された。なお、酸素及び窒素の交互の通気を繰り返すことによって、酸素の吸脱着を繰り返し行うことができた。また、上記酸素化錯体の半寿命は25℃において16時間以上であった。

#### 【0037】実施例2

実施例1で用いたポルフィリン鉄(III)錯体の代わりに、2-(18'-(N-イミダゾリル))オクタデカノイルオキシメチル)-5, 10, 15, 20-テトラキス( $\alpha$ ,  $\alpha$ ,  $\alpha$ ,  $\alpha$ -o-(2, 2-ジメチルオクタデカンアミドフェニル)ポルフィナト鉄(III)錯体(1.4ミリモル)を、ヒト血清アルブミンの代わりに、ウシ血清アルブミンを用いた以外は、実施例1とまったく同じ手法により、2-(18'-(N-イミダゾリル))オクタデカノイルオキシメチル)-5, 10, 15, 20-テトラキス( $\alpha$ ,  $\alpha$ ,  $\alpha$ ,  $\alpha$ -o-(2, 2-ジメチルオクタデカンアミドフェニル)ポルフィナト鉄(II)錯体-アルブミン包接化合物の分散液を調製した。その可視吸収スペクトルは $\lambda_{max}$ が562nm、541nm、436nmであり、デオキシ型に相当する。実施例1と同様に酸素を通気することにより酸素化錯体に相当する可視吸収スペクトル( $\lambda_{max}$ 544nm、423nm)を得た。この酸素化錯体の分散液に窒素を通気すると、元のデオキシ型スペクトルが得られ、酸素の可逆的吸脱着が確認された。なお、この酸素化錯体の半寿命は25℃において15時間以上であった。

#### 【0038】実施例3

2-(8'-(N-イミダゾリル))オクタノイルオキシメチル)-5, 10, 15, 20-テトラキス( $\alpha$ ,  $\alpha$ ,  $\alpha$ ,  $\alpha$ -o-ビバルアミドフェニル)ポルフィナト鉄(III)錯体(1.4ミリモル)をベンゼン(20ml)に溶解し、10%パラジウム黒を少量加え、水素ガスを20分間吹き込んで、中心鉄を還元した後、触媒をろ別した。この溶液に一酸化炭素を通気してポルフィリン鉄錯体を一酸化炭素錯体に転化した後、溶媒を減圧下で留去した。固体残渣を一酸化炭素を通気したジメチルスルホキシド溶液(10ml)に溶解し、これにヒト血清アルブミンのリン酸緩衝水溶液(pH7.4, 1/30mM)100mlを加え、振盪した。その混合液を限外ろ過装置(アドバンテック製ウルトラフィルター:限外分子量20,000)で20mlまで濃縮した。その

濃縮物に92mlのリン酸緩衝水溶液(pH7.4、1/30mM)を加え、振盪した後、再度限外ろ過による濃縮及びリン酸緩衝水溶液による希釈を行った。こうして、所望の一酸化炭素配位ボルフィリン鉄(II)錯体-アルブミン包接化合物の分散液を得た。

【0039】この分散液を窒素換気しながら、氷浴中で光照射(500W)するとデオキシ体が得られた。こうして、目的とする2-(8'-(N-イミダゾリル))オクタノイルオキシメチル)-5,10,15,20-テトラキス( $\alpha$ ,  $\alpha$ ,  $\alpha$ ,  $\alpha$ -o-ビバルアミドフェニル)ボルフィナト鉄(II)錯体-アルブミン包接化合物の分散液を得た。

【0040】この分散液を1/50に希釈し、石英製分光測定用セルに移し、窒素下で密封した。その可視吸収スペクトルは $\lambda_{max}$ が564nm、541nm、435nmであり、分子内塩基が1つ配位した5配位デオキシ型に相当する。

【0041】この分散液に酸素ガスを通気すると、直ちにスペクトルが変化し、 $\lambda_{max}$ 546nm、423nmのスペクトルが得られた。これは、アルブミンに包接されたボルフィリン鉄(II)錯体が酸素化錯体となっていることを明らかに示すものである。この酸素化錯体の分散液に窒素を通気すると、可視吸収スペクトルは酸素化型スペクトルから再びデオキシ型スペクトルへ変化し、これにより酸素の吸脱着が可逆的に生起することが確認された。なお、酸素及び窒素の交互の通気を繰り返すことによって、酸素の吸脱着を繰り返し行うことができた。また、上記酸素化錯体の半寿命は25℃において14時間以上であった。

#### 【0042】実施例4

実施例1において、ヒト血清アルブミンの代りに組換えヒト血清アルブミン(ミドリ十字社製)を用いた以外は全く同様の手法に従い、2-(8'-(2"-メチル-1"-イミダゾリル))オクタノイルオキシメチル)-5,10,15,20-テトラキス( $\alpha$ ,  $\alpha$ ,  $\alpha$ ,  $\alpha$ -o-ビバルアミドフェニル)ボルフィナト鉄(III)錯体-組換えヒト血清アルブミン包接化合物の分散液を得た。その可視吸収は、 $\lambda_{max}$ が562nm、540nm、439nmであり、デオキシ型に相当する。この分散液に、実施例1と同様に酸素ガスを通気すると、酸素化錯体に相当する可視吸収スペクトル( $\lambda_{max}$ 545nm、423nm)を得た。この酸素化錯体の分散液に窒素ガスを通気すると、元のデオキシ型スペクトルが得られ、酸素の可逆的吸脱着を確認した。また、上記酸素化錯体の半寿命は25℃において14時間以上であった。

#### 【0043】実施例5

2-(8'-(N-イミダゾリル))オクタノイルオキシメチル)-5,10,15,20-テトラキス( $\alpha$ ,  $\alpha$ ,  $\alpha$ ,  $\alpha$ -o-(2,2-ジメチルヘキサアミド)フェニル)ボルフィナトコバルト(II)錯体(0.14

ミリモル)のジメチルスルホキシド溶液(12ml)にヒト血清アルブミン(0.1ミリモル)のリン酸緩衝水溶液(pH7.4、1/30mM)100mlを加え、振盪した。その混合液を限外ろ過装置(アドバンテック製ウルトラフィルター:限外分子量20,000)で20mlまで濃縮した。この濃縮物に92mlのリン酸緩衝水溶液(pH7.4、1/30mM)を加え、振盪した後、再度限外ろ過による濃縮及びリン酸緩衝水溶液による希釈を行った。こうして、所望のボルフィリンコバルト(II)錯体-アルブミン包接化合物の分散液を得た。この分散液は、室温又は4℃で数ヵ月間保存しても沈殿・凝集等が認められず、安定であった。この分散液に窒素を通気することによりボルフィリンコバルト(I)錯体をデオキシ体とした。この分散液を1/50に希釈し、石英製分光測定用セルに移し、窒素下で密封した。その可視吸収スペクトルは $\lambda_{max}$ が530nm、411nmであり、分子内塩基が1つ配位した5配位デオキシ型に相当する。

【0044】この分散液に酸素ガスを通気すると、直ちにスペクトルが変化し、 $\lambda_{max}$ 547nm、416nmのスペクトルが得られた。これは、アルブミンに包接されたボルフィリンコバルト(II)錯体が酸素化錯体となっていることを明らかに示すものである。この酸素化錯体の分散液に窒素を通気すると、可視吸収スペクトルは酸素化型スペクトルから再びデオキシ型スペクトルへ変化し、これにより酸素の吸脱着が可逆的に生起することが確認された。なお、酸素及び窒素の交互の通気を繰り返すことによって、酸素の吸脱着を繰り返し行うことができた。また、上記酸素化錯体の半寿命は25℃において11時間以上であった。

#### 【0045】実施例6

土田ら、Chem. Lett., 1994, 1953に記載の方法により合成した8,13-ビス(1'-メトキシエチル)-3,7,12,17-テトラメチル-2,18-ビス(2'-メチルオキシカルボニルエチル)-21,23H-ボルフィリン(0.34mg、0.52ミリモル)を4N塩酸(4ml)に溶解し、室温で20分間攪拌した。この反応混合物をジクロロメタンで抽出し、純水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し、減圧乾固した。これをシリカゲルカラム(ジクロロメタン/メタノール=20/1(容量/容量))で分離精製して、エステル結合の1つを加水分解したモノエステル体を収量165mg(収率:50%)で得た。

【0046】このモノエステル体(165mg、0.26ミリモル)を4-ジメチルアミノピリジン(62.9mg、0.51ミリモル)を含む無水テトラヒドロフラン(5ml)に溶解し、窒素雰囲気下、-15℃に冷却した。これにビバリン酸クロリド(63 $\mu$ l、0.51ミリモル)を加え、30分間攪拌した後、1-(3-ア



ミノプロビル) イミダゾール (150  $\mu$ l, 1.28 ミリモル) を加え、 $-10 \sim 0^\circ\text{C}$  で1時間、さらに室温で4時間反応させた。反応溶媒を減圧除去後、残渣をジクロロメタンで抽出し、純水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過した後、減圧乾固し、これをシリカゲルカラム (クロロホルム/メタノール=20/1 (容量/容量)) で分離精製し、8, 13-ビス (1'-メトキシエチル)-2-(2'-メチルオキシカルボニルエチル)-18-(2'-(3"-イミダゾリル) プロビル) アミノカルボニルエチル-3, 7, 12, 17-テトラメチル-21, 23H-ボルフィリンを収量100mg (収率: 52%) で得た。

【0047】元素分析値 (重量%) : C 69.4 (69.1), H 6.98 (7.14), N 13.4 (13.1) (但し、括弧内の値は、 $\text{C}_x\text{H}_y\text{N}_z\text{O}_w$  に対する計算値を示す)

薄層クロマトグラフィー (メルクシリカゲルプレート、クロロホルム/メタノール=20/1 (容量/容量)) : Rf : 0.42 (モノスポット)

FAB-質量スペクトル : 748 [M]<sup>+</sup>

赤外吸収スペクトル ( $\text{cm}^{-1}$ ) : 1645 ( $\nu_{\text{C=O}}$ , (アミド)), 1732 ( $\nu_{\text{C=O}}$ , (エステル))

可視吸収スペクトル : (クロロホルム)  $\lambda_{\text{max}}$  : 623, 568, 533, 499, 402 nm

$^1\text{H}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, TMS基準)  $\delta$  (ppm) : 10.5, 10.0 (4H, m, メソ位-H), 6.9, 6.1 (3H, t, イミダゾール環H), 6.0 (2H, s, (CH<sub>2</sub>O)CH<sub>2</sub>), 4.3 (4H, t, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COO-), 3.8~3.6 (18H, m, CH<sub>2</sub>O-, CH<sub>2</sub>-), 3.3~3.1 (6H, t, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COO-, -CONHCH<sub>2</sub>-, -), 2.9 (2H, t, -CH<sub>2</sub>Im), 2.3 (6H, s, (CH<sub>2</sub>O)CHCH<sub>2</sub>), 1.8 (3H, s, COOCH<sub>3</sub>), 1.3 (2H, m, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-)。

【0048】こうして得られたボルフィリン誘導体 (100mg, 0.13ミリモル) をジメチルホルムアミド (10ml) に溶解し、十分に窒素置換した後、塩化鉄 (II) (266mg, 1.34ミリモル) を素早く加え、そのまま60°Cで2時間反応させた。反応溶媒を減圧除去して得られた固体残渣をクロロホルムに溶解し、水洗し、有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水処理した。これをろ過したろ液を減圧乾固し、得られた固体残渣をシリカゲルカラム (クロロホルム/メタノール=5/1 (容量/容量)) で分離精製し、目的の分画を集め、真空乾燥した。こうして所望のボルフィリン鉄錯体を収量84mg (収率78%) で得た。

【0049】元素分析値 (重量%) : C 61.8 (61.7), H 6.41 (6.38), N 11.4 (11.7) (但し、括弧内の値は、 $\text{C}_x\text{H}_y\text{N}_z\text{O}_w\text{Fe}$

Clに対する計算値を示す。)

薄層クロマトグラフィー (メルクシリカゲルプレート、クロロホルム/メタノール=10/1 (容量/容量)) : Rf : 0.34 (モノスポット)

FAB-質量スペクトル : 801 [M-Cl]<sup>+</sup>

赤外吸収スペクトル ( $\text{cm}^{-1}$ ) : 1652 ( $\nu_{\text{C=O}}$ , (アミド)), 1728 ( $\nu_{\text{C=O}}$ , (エステル))

可視吸収スペクトル : (クロロホルム)  $\lambda_{\text{max}}$  : 371, 500, 535 nm。

【0050】この錯体 (0.14ミリモル) のジメチルスホキシド溶液 (12ml) にヒト血清アルブミン (0.1ミリモル) のリン酸緩衝水溶液 (pH 7.4, 1/30mM) 100ml を加え、振盪した。その混合液を限外ろ過装置 (アドバンテック製ウルトラフィルター : 限外分子量20,000) で20mlまで濃縮した。この濃縮物に92mlのリン酸緩衝水溶液 (pH 7.4, 1/30mM) を加え、振盪した後、再度限外ろ過による濃縮及びリン酸緩衝水溶液による希釈を行った。こうして、所望のボルフィリン鉄 (III) 錯体-アルブミン包接化合物の分散液を得た。この分散液は、室温又は4°Cで数ヶ月間保存しても沈殿・凝集等が認められず、きわめて安定であった。

【0051】この分散液に少量の亜二チオン酸水溶液を窒素雰囲気下で添加し、ボルフィリン錯体の中心鉄を+2価に還元した。こうして、目的とする8, 13-ビス (1'-メトキシエチル)-2-(2'-メトキシカルボニルエチル)-18-(2'-(3"-イミダゾリル) プロビル) アミノカルボニルエチル-3, 7, 12, 17-テトラメチル-ボルフィナト鉄 (II) 錯体-アルブミン包接化合物の分散液を得た。この分散液を1/50に希釈し、石英製分光測定用セルに移し、窒素下で密封した。その可視吸収スペクトルは $\lambda_{\text{max}}$  が552nm, 419nmであり、分子内塩基が1つ配位した5配位デオキシ型に相当する。

【0052】この分散液に酸素ガスを通気すると、直ちにスペクトルが変化し、 $\lambda_{\text{max}}$  567nm, 536nm, 408nmのスペクトルが得られた。これは、アルブミンに包接されたボルフィリン鉄 (II) 錯体が酸素化錯体となっていることを明らかに示すものである。この酸素化錯体の半寿命は25°Cにおいて1時間以内であった。一方、デオキシ体の分散液に一酸化炭素ガスを通気すると、速やかに一酸化炭素錯体の形成を示すスペクトル ( $\lambda_{\text{max}}$  560nm, 631nm, 412nm) が得られた。この一酸化炭素錯体は室温できわめて安定であった。

#### 【0053】実施例7

実施例1で用いたボルフィリン鉄 (III) 錯体の代わりに、8, 13-ビス (1'- (オクタデカン) エチル) -2-(2'-オクタデカンオキシカルボニル) エチル-18-(2'-(10"- (2-メチルイミダゾリル)

10

20

30

40

50

ル)デカン)アミノカルボニル)エチル-3, 7, 12, 17-テトラメチル-ポルフィナト鉄(III)錯体を用い、ヒト血清アルブミンの代わりに、ウシ血清アルブミンを用いた以外は、実施例5とまったく同じ手法により、8, 13-ビス(1'- (オクタデカン)エチル)-2- (2'-オクタデカンオキシカルボニル)エチル)-18- (2'- (10" (2-メチルイミダゾリル)デカン)アミノカルボニル)エチル-3, 7, 12, 17-テトラメチル-ポルフィナト鉄(II)錯体-アルブミン包接化合物の分散液を調製した。その可視吸収スペクトルは $\lambda_{max}$ が553nm、420nmであり、デオキシ型に相当する。実施例1と同様に酸素を通気することにより酸素化錯体に相当する可視吸収スペクトル( $\lambda_{max}$  567nm、536nm、407nm)を得た。この酸素化錯体の半寿命は25°Cにおいて1時間以内であった。一方、デオキシ体の分散液に一酸化炭素ガスを通気すると、速やかに一酸化炭素錯体の形成を示すスペクトル( $\lambda_{max}$  560nm、531nm、413nm)が得られた。この一酸化炭素錯体は室温できわめて安定であった。

#### 【0054】試験例1

実施例1の包接化合物について、スカチャード・プロットからアルブミンに対するポルフィリン鉄錯体の結合数を決定したところ、結合数は1であった。また、平衡定数は $2.6 \times 10^6$  ( $M^{-1}$ )となり、ビリルビンなどと同程度の強い結合であることが明らかとなった。デオキ

シ体-オキシ体の繰り返しサイクルは25°Cで100回以上観察された。酸素親和度( $P_{1/2}(O_2)$ )は24 Torr (37°C)であった。酸素結合解離平衡曲線より見積もった肺(110 Torr)-末梢組織(40 Torr)間の酸素運搬効率は約20% (37°C)であり、本包接化合物が赤血球代替用の酸素運搬体として有効に作用することが示された。また、酸素結合のエンタルピー/エントロピー変化から、本包接化合物中の酸素配位錯体の挙動は赤血球中のヘモグロビンとほぼ同じであることが明らかにされた。レーザーフラッシュホトリシス法により求めた酸素結合解離速度定数 $k_{on}$ 及び $k_{off}$ は、それぞれ、 $2.4 \times 10^8$  ( $M^{-1}s^{-1}$ )及び $3.2 \times 10^3$  ( $s^{-1}$ )であり、本包接化合物は赤血球よりも迅速に酸素を結合・解離する能力があることが示された。以上の結果から、本包接化合物は、体内を高速流動したときにもそれに追隨して十分に酸素を運搬する能力があることがわかる。

#### 【0055】

【発明の効果】以上説明したように、本発明によれば、ポルフィリン金属錯体を酸素吸脱着部位として含有する酸素運搬体として生体適合性により優れ、生理的条件下でも優れた酸素吸脱着能を示し、工業的規模での製造も比較的容易な置換ポルフィリン金属錯体-アルブミン包接化合物およびこれを有効成分とする酸素運搬体が提供される。